中国生物工程杂志 China Biotechnology,2017,37(7):88-96

DOI:10.13523/j.cb.20170715

人源 Alu RNA 工程菌的构建和表达*

尹舒贤[1] 赵月华[1] 刘 超[2] 吕占军[2]** 王秀芳[2]**

(1 河北医科大学口腔医学院 石家庄 050017)

(2 河北医科大学 河北省实验动物重点实验室 遗传研究室 石家庄 050017)

摘要 目的:外源 RNA 导入细胞特异性上调或下调基因表达,目前外源 RNA 的制备方法主要有化学合成、体外转录、细胞提取。Alu DNA 和 Alu RNA 是人基因组和转录组中最重要的成分,参与基因表达调节。建立工程菌制备基因工程人源 Alu RNA (Alu RNA)的技术,所提取的 RNA 满足一般生物学实验要求。方法和结果:将人 Alu 序列插入 pET-28α 质粒(pET),转化 BL-21 菌,探讨不同条件对 Alu RNA 产生的影响。用 pET-Alu×8 质粒转化 *BM*BL-21(DE3)感受态细胞(简称 DE3),异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导减弱细菌生长;用 IPTG 诱导 2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h 和 16h,用 Northern 杂交检测 Alu RNA 的量,发现诱导 4 小时 RNA 产量最高;1、2、4、8、14 拷贝的 Alu 序列插入 pET,转化 DE3 菌,随拷贝数增加 Alu RNA 产量上升;pET-Alu×8 DE3 菌液,不加 IPTG 诱导,没有 Alu RNA 产生,0.1~0.4mg/ml IPTG 诱导时,Alu RNA 产量没有区别,偏离该浓度时,RNA 产量略下降;34℃、37℃和 40℃培养 pET-Alu×8 DE3 菌液,IPTG 诱导 4h,在 37℃培养条件下,RNA 产量最高;将 pET-Alu×8 质粒转化 3 种 BL-21 感受态细胞,包括 DE3、*BM*BL21-DE3-pLysS(简称 pLysS)和 Trans BL 21(简称 TransBL),发现转化 DE3 感受态细胞后 Alu RNA 产量最高。结论:建立了基因工程制备 Alu RNA 的技术:pET-Alu×14 质粒转化 DE3 菌,37℃培养至 600nm *OD* 为 1.0 时,加入终浓度为 0.2mg/ml 的 IPTG 诱导 4h,获得最高 Alu RNA 产量,纯 Alu RNA 在提取的 RNA 中的含量达 15.8%,每 100ml 菌液纯 Alu RNA 产量平均为 0.46mg。

关键词 基因工程 RNA Alu RNA IPTG 诱导 BL21(DE3)感受态细胞

中图分类号 Q81

RNA 作为基因表达调节的重要因素越来越引起人们的重视[1]。已经证明 RNA 能上调或下调基因表达,参与基因表达调节的 RNA 有 microRNA[2-3]、小激活 RNA(small activating RNA,saRNA)[4-5]、非编码 RNA (non-coding RNA,ncRNA)[6-7]等。细胞中的 RNA 可以由细胞中的 DNA (基因组 DNA 或转染的质粒等)转录产生,也可以由外源导入[5,8]。获得外源导入 RNA(外源 RNA)的方法有 RNA 合成仪合成[9]、体外转录[10]和从细胞中提取[11]。Alu 是人基因组中最重要的非编码序列,占人基因组的 10%[12-13],Alu 序列影响基因表达[14-15]。Alu 家族是灵长类基因组特有的含量丰富的短散在重复序列(short interspersed elements,SINEs),在人基因组中的拷贝数已经达到了 100 万,在所有已知的基因内含子中几乎都发现了 Alu 序列。这一基因家族曾被认为是垃圾序列,但随着研究的深入,Alu 在基因调控表达网络中的功能逐渐被发现,Alu 与人类的疾病密切相关,Alu 元件的插入、删除和重组导致了许多先天性遗传疾病和癌症,并且可能影响人类衰老,在人类多样性中也发挥重要作用。目前,对于 Alu 序列的功能了解得还不透彻,推测主要参与基因调控、基因重排、CpG 甲基化、hnRNA 选择性剪切、结合转录因子和激素等。本文用 Alu RNA 为例建立用基因工程菌制备人源 Alu RNA(Alu RNA)的方法,该方法也适于制备其

收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-03-24

* 河北省大学生创新性实验计划(USIP2016066),河北省自然科学基金(H2013206101,C2011206043)资助项目

**通讯作者,电子信箱:zhanjun_lv@hotmail.com;wangxiufang@live.cn

他人源 RNA。制备的人源 RNA 可用于细胞学实验。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和耗材

pET-28α 质粒为本研究室保存;尼龙转移膜(Positively CHGD. Nylon transfer membrane,英国 GE Healthcare 公司);卵白素-过氧化物酶(avidin-peroxidase,武汉博士德生物);生物素标记 dUTP(biotin-16-dUTP,瑞士罗氏生物科技公司);*BM*BL21-DE3(简称 DE3)、*BM*BL21-DE3-pLysS(pLysS)和 Trans BL 21(TransBL)感受态细胞(北京博迈德生物);辣根酶化学发光液(美国 Life Technologies 公司);*Hind* Ⅲ和 *Nhe* Ⅰ等限制酶(大连 TaKaRa 公司);T4 DNA 连接酶(T4 DNA Ligase, Thermo Scientific 公司);DNase Ⅰ(RNase free,Thermo Scientific 公司);RNase A(Solarbio 公司);RNase 抑制剂(RNase inhibitor, Thermo Scientific 公司);鱼精 DNA(Solarbio 公司);质粒小提试剂盒(北京 Tiangen 生物公司);异丙基硫代半乳糖苷(IPTG, Solarbio 公司);封闭专用脱脂奶粉(北京普利莱基因技术公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 pET-Alu 质粒构建　本研究室在以往的研究中已经成功构建了 C1-Alu×1as(将 1 拷贝的 Alu 元件反向插入 pEGFP-C1 质粒的 *EGFP* 基因下游构建而成)、C1-Alu×2as、C1-Alu×4as、C1-Alu×8as、C1-Alu×14as 质粒[16]。用 *Hind* Ⅲ和 *Nhe* Ⅰ分别酶切这些 C1 衍生质粒,1% 琼脂糖电泳,切胶,分离插入片段。pET-28α 用 *Hind* Ⅲ和 *Nhe* Ⅰ酶切,电泳,切胶分离质粒片段。将插入片段和 pET 质粒片段用 T4 DNA 连接酶连接,将构建的质粒转化 DH5α 大肠杆菌感受态,按常规方法涂平板、提质粒、酶切和测序鉴定,即构建成 pET-Alu×1、pET-Alu×2、pET-Alu×4、pET-Alu×8、pET-Alu×14 质粒。

1.2.2 BL-21 转化及 IPTG 诱导　本文中使用了 3 种 BL-21 大肠杆菌(DE3、pLysS 和 TransBL),它们的感受态细胞用 pET 或 pET-Alu 质粒热激法转化,涂平板,提质粒,酶切鉴定,选正确质粒转化菌,摇菌用 LB-卡那霉素(终浓度 30μg/ml)培养至 600nm *OD* 值为 0,加入 IPTG(终浓度 0.2mg/ml),37℃ 继续摇菌 4h。改变 IPTG 浓度,改变摇菌时间,培养温度等条件在文中注明。

1.2.3 Alu RNA 制备　用热酚法制备 Alu RNA[11]。具体方法简述如下:10ml 菌液离心后,在沉淀中加入 2% SDS-0.15mol NaCI 2ml,再加水饱和酚 1ml,60℃ 30min,冷却后加氯仿 0.5ml,离心取上清液,加 3 倍体积无水乙醇,4℃沉淀 30min,12 000r/min 离心,75% 乙醇洗沉淀 2 次,加上清液 1/10 体积的 DNase Ⅰ(终浓度 0.5U/ml)-RNase 抑制剂(终浓度 0.5U/ml)消化残存的 DNA,获得无 DNA 污染的 Alu RNA。为了检测所获得的 RNA 是否含有 DNA 污染,在 DNase Ⅰ消化的基础上用 RNase A(终浓度 100μg/ml)消化。提取的 Alu RNA 用 Northern 杂交进行检测。

1.2.4 Northern 检测 Alu RNA　1mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP 等量混合,1mmol/L dTTP 的加入量为 dATP 的 2/3,1mmol/L Biotin-16-dUTP 的加入量为 dATP 的 1/3,配制出 0.25mmol/L Biotin-dNTP。用 C1-Alu×8 质粒作为模板,Alu140F 作为上游引物(5′GTG GTG GCG GGT GCC TGT AG),AluR 作为下游引物(5′ TGA GAC GGA GTC TCG CTG TG),扩增 Alu 序列的 140bp 片段,PCR 反应液中含有终浓度为 0.1mmol/L 的 Biotin-dNTP,PCR 反应液中的其他成分为常规组成。PCR 循环条件:94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环。即制备出 Biotin 标记的 Alu 探针。

Alu RNA 经甲醛变性胶电泳后转尼龙膜[17],用次甲基蓝染色,预杂交液(含 1% 脱脂专用奶粉,10mg/ml 鱼精 DNA)封闭,换为杂交液(预杂交液中加入 Biotin 标记的 Alu 探针),于 HL-2000 HybriLinker 杂交炉中,42℃旋转杂交过夜。冲洗后,加入 1:200 稀释的卵白素-过氧化物酶,摇床反应 1h,冲洗后加入辣根酶化学发光液,伯乐成像分析系统(ChemiDoc™ Touch, Bio-RAD 公司)照相。用 Gel-Pro-analyzer 软件分析积分光密度(IOD)值。

2 结果与分析

2.1 表达载体构建及酶切鉴定

Hind Ⅲ/*Nhe* Ⅰ酶切 C1-Alu×1as、C1-Alu×2as、C1-Alu×4as、C1-Alu×8as、C1-Alu×14as 质粒,1% 琼脂糖电泳,切胶分离小片段,插入 *Hind* Ⅲ/*Nhe* Ⅰ酶切的 pET 质粒,获得 pET-Alu×1 正(简称 pET-Alu×1)、pET-Alu×2、pET-Alu×4、pET-Alu×8、pET-Alu×14 质粒。插入位置示意图见图 1a。*Hind* Ⅲ/*Nhe* Ⅰ酶切电泳 EB 染色图见图 1b,酶切电泳结果符合预计结果。

2.2 IPTG 诱导和不诱导细菌生长曲线

pET-Alu×8 DE3 菌、pET DE3 菌、DE3 菌,共 3 种

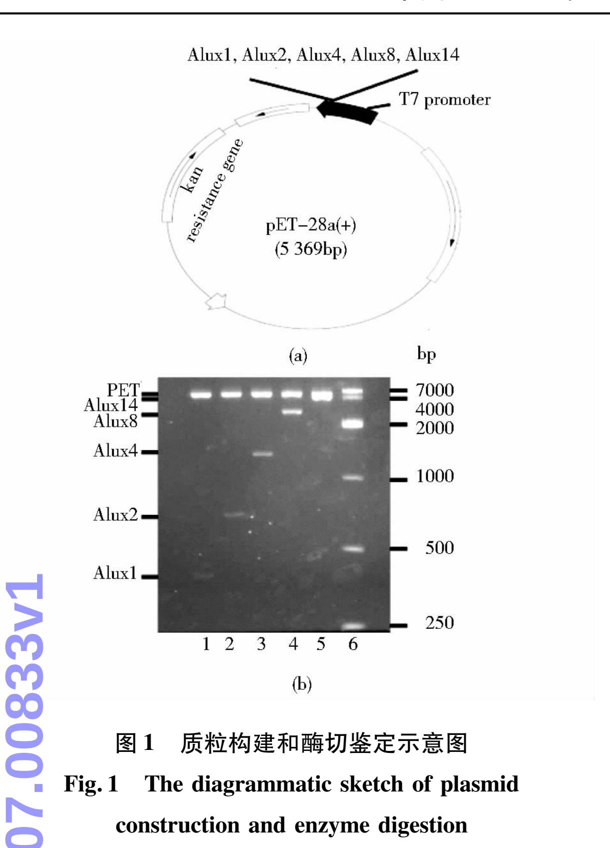


图 1 质粒构建和酶切鉴定示意图

Fig. 1 The diagrammatic sketch of plasmid construction and enzyme digestion

(a) Schematic diagram of plasmid construction (b) Agarose gel electrophoresis images of plasmids being digested lane 1: pET-Alu ×1; lane 2: pET-Alu ×2; lane 3: pET-Alu ×4; lane 4: pET-Alu ×8; lane 5: pET-Alu ×14; lane 6: Marker

菌摇菌培养，调 600nm *OD* = 1.0。不加 IPTG 或加 IPTG，培养 1h、2h、3h、4h、5h、7h、9h，分别取出 1 份测定 600nm *OD* 值。发现 3 种菌不加 IPTG 诱导，*OD* 值在2.6 左右进入平台期；加 IPTG 诱导，pET-Alu ×8 DE3 菌、pET DE3 菌在 1.3 左右进入平台期，说明 IPTG 抑制该 2 种菌的生长，加 IPTG 对 DE3 菌生长影响不大(图 2)。

2.3 IPTG 诱导时间的作用

pET-Alu ×8 DE3 菌在 37℃培养至 600nm *OD* 值为 1.0 时，加 IPTG 0.2mg/ml 诱导 2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h，提取 RNA 进行 Northern 检测，发现 2 ~ 4h RNA 表达达到高峰，8 ~ 14h 维持在相对恒定的低水平，16h 时 RNA 表达明显下降(图 3a)，图 3b 是次甲基蓝染色显示的上样 RNA 量。用 Gel-Pro-analyzer 分析软件计算图 3a 中每一个泳道的条带积分光密度(IOD)，所得结果如图 3c 所示。

2.4 IPTG 浓度对 RNA 产量的影响

pET-Alu ×8 DE3 菌液，不加 IPTG 诱导，没有 Alu RNA 产生(图 4 泳道 1)，0.1 ~0.4mg/ml IPTG 诱导时，

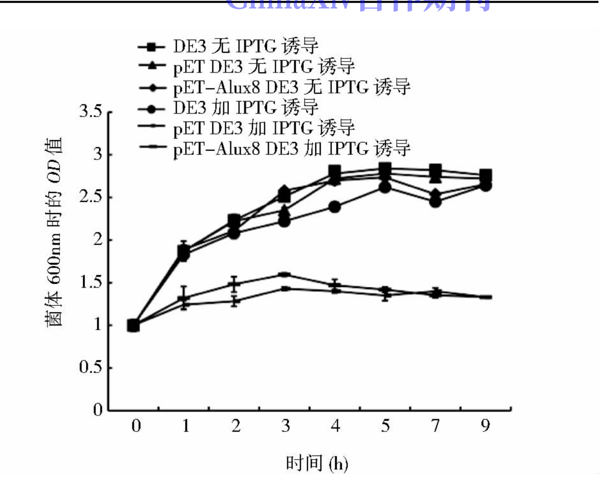


图 2 IPTG 诱导对菌体生长的影响

Fig. 2 Effects of IPTG induction on growth of bacteria

Alu RNA 产量没有区别，偏离该浓度时，RNA 产量略下降(图 4)。

2.5 插入 Alu 拷贝数的作用

pET-Alu ×1 DE3 菌、pET-Alu ×2 DE3 菌、pET-Alu ×4、pET-Alu ×8 DE3 菌、pET-Alu ×14 DE3 菌，*OD* 1.0 时加 IPTG 诱导 4h，提取 RNA Northern 检测，随 Alu 拷贝数的增加，Alu RNA 产量上升(图 5a)，图 5b 是次甲基蓝染色显示的上样 RNA 量。图 5c 是根据图 5a 绘制的杂交信号强度图。

2.6 工程菌的培养温度对 RNA 产量的影响

pET-Alu ×8 DE3 菌在 37℃培养至 600nm *OD* 值为 1.0 时，加入终浓度为 0.2mg/ml 的 IPTG 于 34℃、37℃和 40℃培养 4h，提取 RNA，Northern 杂交结果和次甲基蓝染色结果见图 6a 和图 6b；图 6c 为图 6a 的软件分析 IOD 结果。显示，37℃培养 Alu RNA 产量最大(泳道 1)，其次为 34℃培养(泳道 2)，40℃培养几乎没有 Alu RNA 产生(泳道 3)。

2.7 宿主菌类型对 RNA 产量的影响

pET-Alu ×8TransBL 菌、pET-Alu ×8 DE3 菌和 pET-Alu ×8pLysS 菌，分别培养到 600nm *OD* 值为 1.0，加入终浓度为 0.2mg/ml 的 IPTG，于 37℃ 培养 4h，提取 RNA，Northern 杂交结果和次甲基蓝染色结果见图 7a、b；图 7c 为图 7a 的软件分析 IOD 结果。显示，pET-Alu ×8 DE3 菌 Alu RNA 产量最大(泳道 2)，其次为 pET-Alu ×8pLysS 菌(泳道 3)，pET-Alu ×8TransBL 菌没有 Alu RNA 产生(泳道 1)。

2.8 DNA 酶和 RNA 酶消化 Alu RNA

pET-Alu ×8 DE3 菌 IPTG 诱导，热酚法提取 RNA，

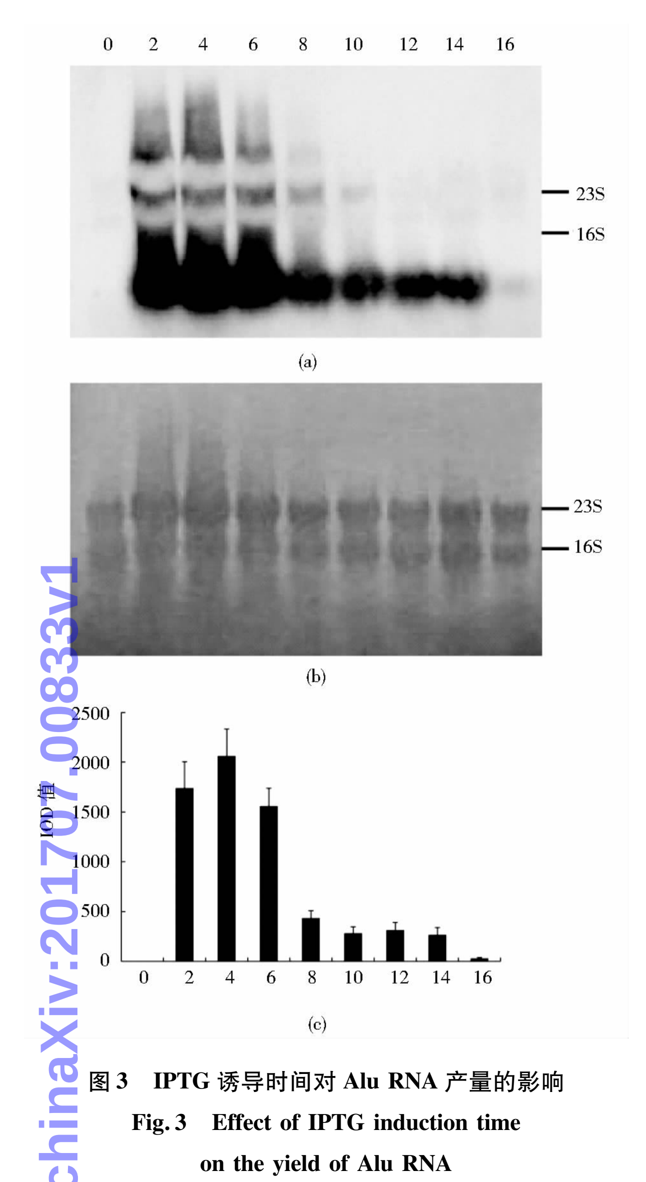


图 3　IPTG 诱导时间对 Alu RNA 产量的影响

Fig. 3　Effect of IPTG induction time on the yield of Alu RNA

(a) The results of northern blotting after different time induced by IPTG　(b) Dyeing results of methylene blue　(c) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments)

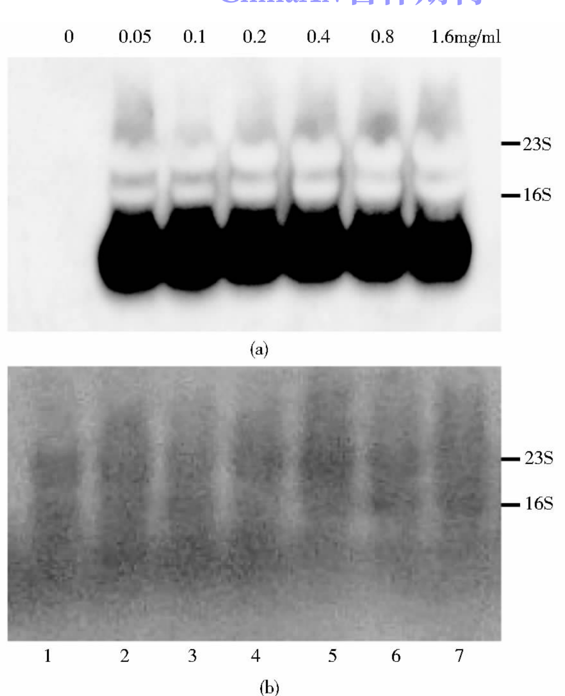


图 4　IPTG 浓度对 Alu RNA 产量的影响

Fig. 4　Effects of IPTG concentrations on yield of Alu RNA

(a) Northern detection results after 4 hours induction by different concentrations of IPTG　(b) Dyeing results of methylene blue

DNase Ⅰ 消化去除残存的 DNA(图 8a,泳道 1),不用 DNase Ⅰ 消化(图 8a,泳道 2),DNase Ⅰ 和 RNase A 消化,去除残存的 DNA 和 RNA(图 8a,泳道 3),然后做 Northern 杂交检测 Alu RNA,结果见图 8。泳道 1 和泳道 2 的 IOD 值没有明显的区别,说明热酚法提取的 RNA 中质粒 DNA 所造成的探针杂交信号不起主要作用。泳道 3 没有杂交信号,说明 RNA 在杂交信号出现中起主要作用。

2.9　Alu RNA 产量的估算

因为 pET-Alu × 14 DE3 菌的 Alu RNA 产量最高(图 5,泳道 6),因此用 pET-Alu × 14 DE3 菌进行实验,对 Alu RNA 的产量进行估算。将菌体培养至 *OD* 值为 1.0 时加入 0.2mg/ml IPTG,37℃ 培养 4h,提取 RNA,6 次实验每 100ml 菌液获得的 RNA 产量为(2.94 ± 0.59)mg。RNA 经 Northern 检测,同时以正向 Alu 单链 DNA 作为参照(称为参照 Alu),RNA 上样量 5μg/孔,Alu 参照 0.2μg/孔,图 9a 显示 Northern 杂交结果,图 9b 是两个泳道的 IOD 值。Alu RNA 孔的信号强度是 DNA 信号强度的 3.95 倍。如果忽略 RNA 和 DNA 结合能力的差异,那么所制备的 Alu RNA 中有 15.8% 属于纯 Alu RNA。纯 Alu RNA 在所提取的 Alu RNA 中所占比例的计算步骤如下:参照 Alu μg 数(本文为 0.2μg) ×(Alu RNA 泳道的 IOD 值/参照 Alu 的 IOD 值) = Alu RNA 泳道中的纯 Alu RNA 的 μg 数;(纯 Alu RNA μg/Alu RNA 上样量 μg) ×100% = 纯 Alu RNA 在所提取 Alu RNA 中所占的比例。每 100ml 菌液可提取 2.94mg RNA,其中 Alu RNA 的含量占 15.8%,那么每 100ml 菌液纯 Alu RNA 产量平均为 0.46mg。

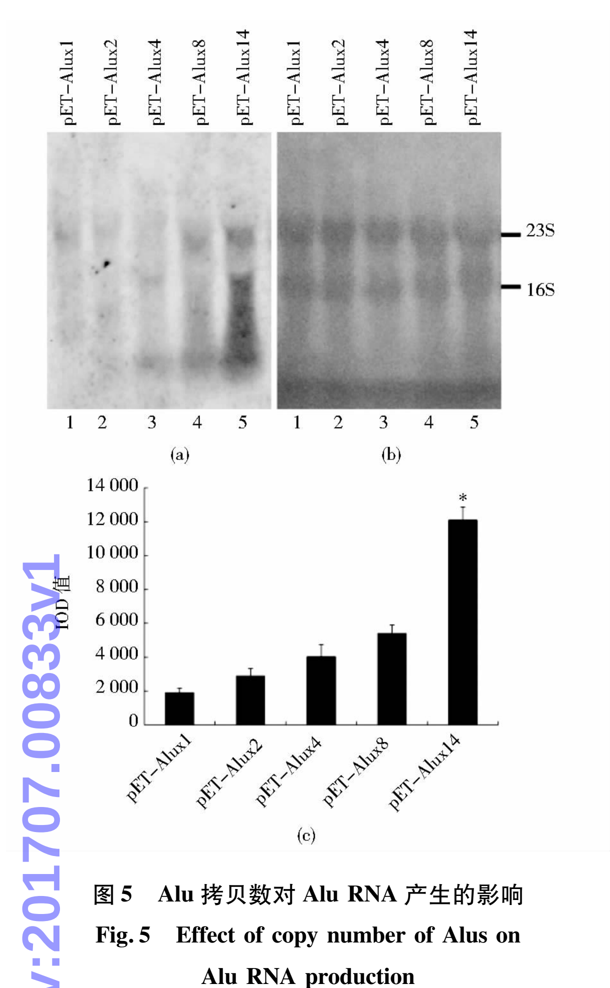


图 5 Alu 拷贝数对 Alu RNA 产生的影响

Fig. 5 Effect of copy number of Alus on Alu RNA production

(a) The results of northern detection 1, 2, 4, 8 or 14 copies of Alu elements were inserted into the pET plasmid to construct pET-Alu plasmids that were transformed into DE3 bacteria, the northern blot results showed that Alu RNA production amount increased with the increase of Alu copy number (b) Dyeing result of methylene blue (c) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments * : The Alu RNA yield of pET-Alu 14 plasmid was significantly higher than that of other plasmids

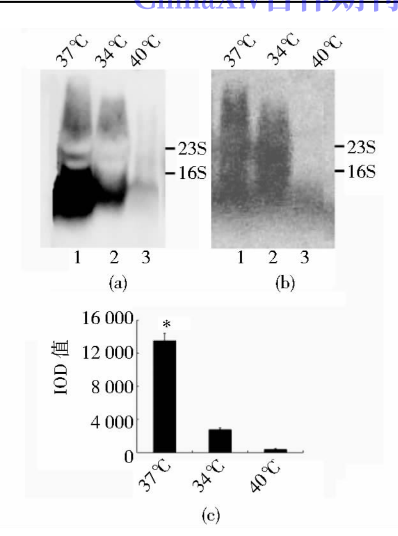


图 6 pET-Alu ×8 DE3 菌培养温度对 Alu RNA 产量的影响

Fig. 6 Effects of culture temperature of pET-Alu ×8 DE3 bacteria on production amount of Alu RNA

(a) The results of Northern blotting pET-Alu × 8 DE3 bacteria were cultured at 34℃, 37℃ or 40℃ and then were induced by IPTG for 4 hours, we found Alu RNA production was the highest under the 37℃ cultivation (b) Dyeing result of methylene blue (c) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments) * : The Alu RNA yield was the highest under the 37℃ cultivation and was significantly higher than that of other culture temperature

3 讨 论

外源 RNA 有调节基因表达作用[17-20]。Elbashir 等[21]证明合成的 siRNA 转染进入培养的人细胞后,能进入 RNA 诱导沉默复合体,降解靶 mRNA 进而沉默基因表达。本实验室最近的研究发现,从细胞中提取的外源性肝 RNA 能诱导小鼠成纤维细胞白蛋白基因的 DNase Ⅰ 消化敏感性上升,提示外源 RNA 有改变染色质构象的作用[11]。

外源 RNA 的获得途径包括:RNA 合成仪合成[9]、体外转录[10]和从细胞中提取[11]。BL-21 大肠杆菌属于缺陷型细菌,适当质粒转化后,经 IPTG 诱导能产生大量基因工程蛋白[22-23],是产生基因工程蛋白的常用菌。本文中,建立用 BL-21 大肠杆菌基因工程方法制备人源 Alu RNA 的方法,制备出的 RNA 作为外源 RNA 用于生物学实验。

DE3 菌、pET-DE3 菌、pET-Alu ×8-DE3 菌用 LB-卡那霉素培养基培养,不加 IPTG 诱导,菌液 600nm *OD* 值为 2.8 时达到平台值。三种菌分别用 IPTG 诱导后,DE3 菌的生长曲线与没有诱导的类似;pET-DE3 菌、pET-Alu ×8-DE3 菌在 *OD* 值为 1.3 左右时达到平台期。pET-DE3 菌和 pET-Alu × 8-DE3 菌在不加 IPTG 时,不降低细菌的生长,加入 IPTG 后降低细菌生长;DE3 菌加 IPTG 和不加 IPTG 细菌生长曲线类似(图 2)。说明单纯 IPTG 不影响细菌的生长,IPTG 和 pET 质粒联用才能降低细菌生长;pET 和 pET-Alu ×8 质粒转化加 IPTG 均降低细菌生长,说明降低细菌生长的原因不是来自 Alu 序列,而是 pET 质粒的原因。

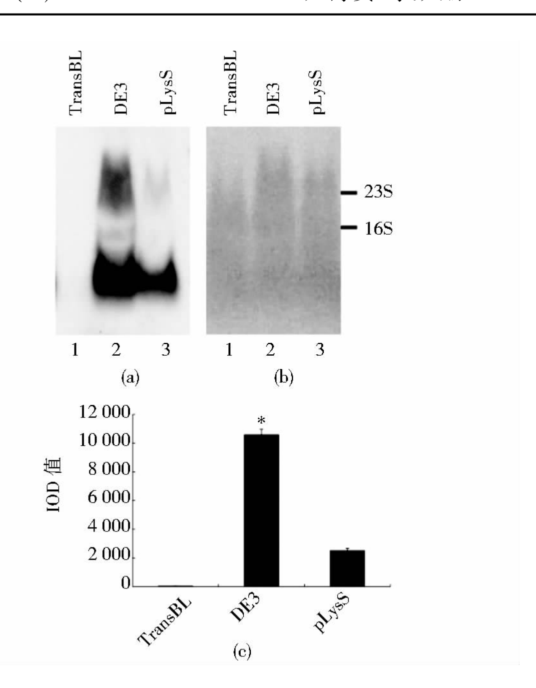


图 7　pET-Alu ×8 转化不同类型 BL-21 宿主菌对 Alu RNA 产量的影响

Fig. 7　Effects of types of BL-21 host bacteria on production amount of Alu RNA

(a) The result of northern detection. pET-Alu × 8 plasmid was transformed into three kinds of BL-21 cells, including DE3, BMBL21-DE3-pLysS (pLysS) and Trans BL-21 (TransBL), Northern blotting showed that Alu RNA production was the highest when using pET-Alu ×8 DE3　(b) Dyeing results of methylene blue　(c) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments)　*: The Alu RNA yield was the highest using DE3 engineering bacteria and was significantly higher than that of other bacteria ($P<0.01$)

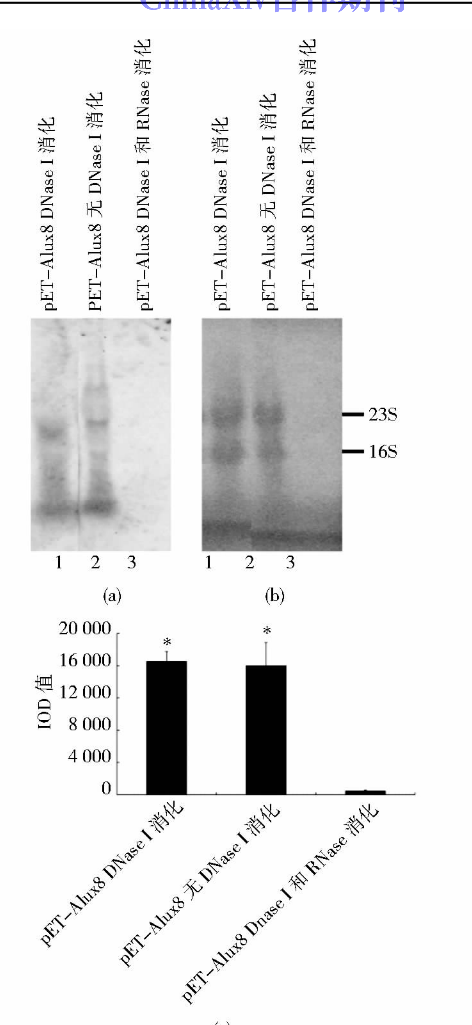


图 8　DNA 酶和 RNA 酶消化的影响

Fig. 8　Effects of digestion of DNA enzyme and RNA enzyme

(a) The result of northern detection　RNA was extracted from pET-Alu ×8 DE3 bacteria induced by IPTG and digested with DNase Ⅰ (lane 1), without DNase Ⅰ (lane 2), or with DNase Ⅰ plus RNase A (lane 3). RNA was detected using Northern blotting　(b) Dyeing results of methylene blue　(c) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments)　*: The Alu RNA yield of pET-Alu 8 DNase Ⅰ digestion and pET-Alu 8 without DNase Ⅰ digestion was significantly higher than that of pET-Alu 8 DNase Ⅰ plus RNase A digestion ($P<0.01$)

张树军等[24]证明 YfiF 融合蛋白质在 IPTG 诱导 9h 时蛋白质产量达到高峰,11h 和 9h 的表达量类似。本文证明 IPTG 诱导 4h Alu RNA 产量达到高峰,8h 以后显著降低,这可能是因为 RNA 容易降解,蛋白质更容易积累的缘故。张树军等[24]用终浓度为 0.1 ~ 1mmol/L的 IPTG 诱导工程菌,测定 YfiF 融合蛋白质,发现提高 IPTG 浓度没有增加蛋白质表达量。本文中用终浓度为 0.05 ~ 1.6mg/ml(0.21 ~ 6.72mmol/L)的 IPTG 诱导 pET-Alu × 8-DE3 菌,发现 0.1 ~ 0.4mg/ml(0.42 ~ 1.68mmol/L)的诱导效率较高,偏离该范围诱导量略有下降(图 4)。

改变串联 Alu 拷贝数增加 RNA 量是本文的独特设计。因为产生基因工程蛋白质需要考虑基因的读码框,此外还要考虑 5′上游非编码区和 3′下游非编码区的结构,不适合通过增加基因拷贝数提高诱导量。本文的结果显示,随 Alu 拷贝数增加 Alu RNA 的诱导量明显上升(图 5),pET-Alu ×14-DE3 菌中 Alu RNA 的表达量是 pET-Alu ×8-DE3 菌的 2 倍。

本文中使用三种不同基因型的 BL21 菌作为宿主

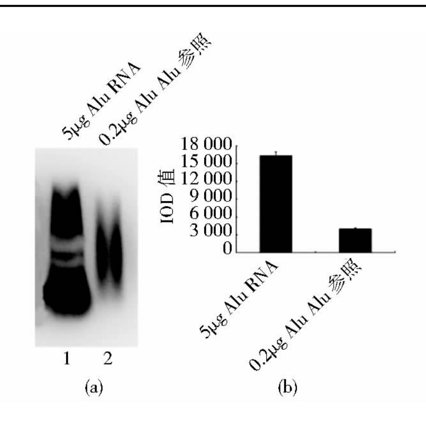


图 9　对 Alu RNA 的产量进行估算

Fig. 9　The estimation of production amount of Alu RNA

(a) The results of northern detection. RNA was extracted from pET-Alu × 14 DE3 bacteria induced by IPTG and digested with DNase Ⅰ. 5μg RNA digested with DNase Ⅰ was loaded in lane 1, 0.2μg reference Alu was loaded in lane 2　(b) IOD values of each lane of the northern blotting results (means of three independent experiments)

菌。DE3 适合于 pET 衍生质粒无毒性基因工程蛋白质的表达，pLysS 适合于 pET 衍生质粒有毒性基因工程蛋白质的表达，TransBL 不适合 pET 衍生质粒的基因工程蛋白质的表达。在本文中 pET-Alu × 8-DE3 菌和 pET-Alu × 8-pLysS 菌在 IPTG 诱导的情况下均能产生 Alu RNA，其中 pET-Alu × 8-DE3 菌产量较高（图 7）。

为了证明 Alu RNA 诱导的特异性，本文使用 pET-Alu × 8-TransBL 菌株进行 IPTG 诱导实验，发现没有 Alu RNA 的产生（图 7 泳道 1），说明仅有质粒而没有合适的宿主菌，不能诱导 Alu RNA 的产生。pET-Alu × 8-DE3 菌如果不用 IPTG 诱导也不会产生 Alu RNA（图 4 泳道 1），说明 IPTG 诱导对于 Alu RNA 的产生是必要的。pET 质粒插入序列转录需要 T7 RNA 聚合酶，该聚合酶属于 IPTG 诱导型。DE3 和 pLysS 菌中含有 IPTG 诱导型的 T7 RNA 聚合酶，TransBL 菌不含有 IPTG 诱导型的 T7 RNA 聚合酶。pET-Alu × 8-DE3 菌不加 IPTG 则不产生 T7 RNA 聚合酶，Alu RNA 诱导为阴性，pET-Alu × 8-TransBL 菌加 IPTG 也不能产生 Alu RNA，这说明本实验 Alu RNA 诱导的特异性。本文中经 IPTG 诱导才能使基因工程菌产生 Alu RNA，这与基因工程蛋白质诱导的结果类似[25]。

为了检测 DNA 和 RNA 在 Northern 杂交信号中的作用，本文中进行了核酸酶消化实验。DNase Ⅰ 消化与不消化的比较，杂交信号区别不显著（图 8 泳道 1vs 泳道 2），说明 DNA 污染在 Northern 杂交信号强度上所起的作用不大；于 DNase Ⅰ 消化的基础上再用 RNase A 消化，完全失去杂交信号（图 8 泳道 3），说明检测到的杂交信号属于 RNA。

本文 Northern 实验中所用的 Alu RNA 采用热酚法提取，Alu RNA 以小片段为主。用 Gel-Pro-analyzer 和伯乐分子质量分析系统检测，以 23S rRNA（2 900nt）与 16S rRNA（1 540nt）作为分子质量参照，Alu RNA 集中在 600bp 左右。Northern 印记膜次甲基蓝染色显示 23S rRNA 与 16S rRNA 的比例大约是 2∶1（图 3b），说明热酚法提取的 RNA 并未降解，因此提取的 Alu RNA 中以小片段为主，不是提取过程中 Alu RNA 降解的缘故。

本文中用 Alu 单链 DNA 作为参照对提取的 Alu RNA 进行了定量检测。如果忽略 DNA 单链和 RNA 单链与探针杂交信号的差异，那么 DNA 的杂交信号强度就能反应 RNA 的杂交信号强度。上样总 RNA 为每孔 5μg，单链 Alu DNA 的量为每孔 0.2μg。Alu × 14 RNA 的信号强度是 Alu 参照的 3.95 倍（图 9）。所以 5μg 上样量中约含有 0.79μg Alu RNA，Alu RNA 约占总 RNA 的 15.8%。细菌总 RNA 中以 rRNA 为主，其次为 tRNA，本文中使用 T7 启动子，IPTG 诱导，使纯 Alu RNA 达到总 RNA 的 15.8%，每 100ml 菌液可产生纯 Alu RNA 0.46mg。综上所述，本文建立了制备基因工程人源 Alu RNA 的技术。今后的工作设想是使用亲和层析技术进一步提高 Alu RNA 的纯度。

参考文献

[1] Wang X, Ma Z, Cheng J, et al. A genetic program theory of aging using an RNA population model. Ageing Research Reviews, 2014, 13: 46-54.

[2] Chen G, Gao X, Wang J, et al. Hypoxia-induced microRNA-146a represses Bcl-2 through Traf6/IRAK1 but not Smad4 to promote chondrocyte autophagy. Biological Chemistry, 2017, 398(4):499-507.

[3] Zhang Z, Ran Y, Shaw T S, et al. MicroRNAs 10a and 10b regulate the expression of human platelet glycoprotein Ibα for normal megakaryopoiesis. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11):1873.

[4] Li L C, Okino S T, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(46): 17337-17342.

[5] Voutila J, Strom P, Mintz P, et al. Gene expression profile changes after short-activating RNA-mediated induction of endogenous pluripotency factors in human mesenchymal stem cells. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2012, 1(8): e35.

[6] Sun C C, Li S J, Li G, et al. Long intergenic noncoding RNA 00511 acts as an oncogene in non-small-cell lung cancer by binding to EZH2 and suppressing p57. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2016, 5(11): e385.

[7] Ahn R, Gupta R, Lai K, et al. Network analysis of psoriasis reveals biological pathways and roles for coding and long non-coding RNAs. BMC Genomics, 2016, 17(1): 841.

[8] Hélène C, Toulmé J J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1049(2): 99-125.

[9] Wickstrom E. DNA and RNA derivatives to optimize distribution and delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 87: 25-34.

[10] Voloudakis A E, Holeva M C, Sarin L P, et al. Efficient double-stranded RNA production methods for utilization in plant virus control. Methods in Molocular Biology, 2015, 1236: 255-274.

[11] Wang X, Ma Z, Kong X, et al. Effects of RNAs on chromatin accessibility and gene expression suggest RNA-mediated activation. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016, 79: 24-32.

[12] Sela N, Mersch B, Gal-Mark N, et al. Comparative analysis of transposed element insertion within human and mousegenomes reveals Alu's unique role in shaping the human transcriptome. Genome Biology, 2007, 8(6): R127.

[13] Häsler J, Strub K. Alu RNP and Alu RNA regulate translation initiation *in vitro*. Nucleic Acids Research, 2006, 34(8): 2374-2385.

[14] Ma Z, Jing X, Cheng J, et al. The effects of a short sequence enhancer (5′-GTGAAATAAATGCAAATAAAGT) and its derived sequences on green fluorescent protein expression. Genes & Genomics, 2014, 36: 455-464.

[15] Lv Z, Cheng J, Xie Y, et al. Finding of *IFNγ* gene enhancers and their core sequences. Genome, 2013, 56: 147-154.

[16] 段肖翠, 靳霞, 谢英, 等. L1-ORF2 不同片段对报告基因表达产生不同影响. 遗传, 2009, 31 (1): 50-56.
Duan X C, Jin X, Xie Y, et al. Different effects on reporter gene expression by distinct L1-ORF2 segments, 2009, 31 (1): 50-56.

[17] Cheng J, Wang X, Cai N, et al. RNAs specifically affect gene expression in a length, position and sequence dependent manner. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7(3): 48-58.

[18] Zheng L, Wang L, Gan J, et al. RNA activation: promise as a new weapon against cancer. Cancer Letter, 2014, 355(1): 18-24.

[19] Morris K V. RNA-directed transcriptional gene silencing and activation inhuman cells. Oligonucleotides, 2009, 19(4): 299-306.

[20] Janowski B A, Younger S T, Hardy D B, et al. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targetedduplex RNAs. Nature Chemical Biology, 2007, 3(3): 166-173.

[21] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411(6836):494-498.

[22] Tsai W C, Wu T C, Chiang B L, et al. Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i1 in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2016, 130: 35-43.

[23] Nasiri K, Zibaee S, Nassiri M, et al. Production of specific IgY antibody to the recombinant FanC protein produced in *Escherichia coli*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2016, 19(8): 883-889.

[24] 张树军, 狄建军, 张国文. 大肠杆菌 *yfiF* 基因原核表达系统构建、表达条件优化及蛋白纯化. 生物技术, 2016, 26(3): 229-233.
Zhang S J, Di J J, Zhang G W, et al. Construction of prokaryotic expression system of *Escherichia coli* yfiF gene, optimization of expression conditions and purification of protein. Biotechnology, 2016, 26(3): 229-233.

[25] 李佳楠, 杨薇, 吴红梅 等. 人 β-NGF 在大肠杆菌中的表达、纯化及活性测定. 中国药学杂志, 2014, 49(20): 1785-1790.
Li J N, Yang W, Wu H M, et al. Expression, purification and anctivity determination of human-NGF in *Escheeichia coli*. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 49(20): 1785-1790.

Construction and Expression of Engineering Bacteria Producing Humanized Alu RNA

YIN Shu-xian[1] ZHAO Yue-hua[1] LIU Chao[2] LV Zhan-jun[2] WANG Xiu-fang[2]
(1 School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)
(2 Department of Genetics, Hebei Medical University, Hebei Key Lab of Laboratory Animal, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Objective: Exogenous RNAs can specifically up-regulate or down-regulate gene expression after they enter into cells. The preparation methods of exogenous RNAs mainly include chemical synthesis, *in vitro* transcription and extraction from cells. Alu DNA and Alu RNA are the main constituents of human genome and transcriptome and participate in gene expression regulation. The technology method of preparing genetically engineered humanized Alu RNA (Alu RNA) from engineering bacteria was established. The extracted RNAs using this technology method can satisfy the requirement of general biology experiments. Methods and results: Different copies of human Alu elements were inserted into pET-28α plasmid (pET) to construct pET-Alu plasmids that were transformed into BL-21 bacteria. The effects of different conditions on the Alu RNA production were explored. Isopropylthio-β-d-galactoside (IPTG) induction inhibited transformed bacterial growth after *BM*BL-21 (DE3) competent cells (DE3 cells) were transformed by pET-Alu ×8 plasmid (8 copies of Alus were inserted into pET); Northern blotting was used to detect the amount of Alu RNA after 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 hours inducing with IPTG. The results showed that the amount of Alu RNA was highest at 4 hours; 1, 2, 4, 8 or 14 copies of Alu elements were inserted into the pET to construct pET-Alu plasmids that were transformed into DE3 bacteria, the Northern blotting results showed that Alu RNA production amount increased with the increase of Alu copy number; pET-Alu ×8 DE3 bacteria did not produce Alu RNA without IPTG induction, Alu RNA production kept similar when inducing by 0.1mg/ml to 0.4mg/ml IPTG induction, however, Alu RNA production slightly decreased if deviating from the above concentration range; pET-Alu ×8 DE3 bacteria were cultured at 34℃, 37℃ or 40℃ and then were induced by IPTG for 4 hours, the results showed that, under the condition of 37℃ cultivation, Alu RNA production was the highest; pET-Alu ×8 plasmid was transformed into three kinds of BL-21 cells, including DE3, *BM*BL21-DE3-pLysS (pLysS) and Trans BL 21 (TransBL), the results showed that Alu RNA production was the highest when using pET-Alu ×8 DE3. Conclusion: The preparation technology of genetically engineered humanized Alu RNA was established. The highest production of Alu RNA can be obtained based on the following conditions: pET-Alu ×14 plasmid was transformed into DE3 bacteria; the transformed bacteria were cultured at 37℃ to *OD* 1.0 at 600nm, and then were induced by 0.2mg/ml IPTG for 4 hours. Pure Alu RNA occupies 15.8% of extractive RNA and the mean yield of pure Alu RNA in 100ml bacteria solution is 0.46mg.

Key words Genetically engineered RNA Alu RNA IPTG induction BL21(DE3) competent cells